

**Zur Analytik und Isolierung
von Phosphatiden**

G. Richter

Zur Analytik und Isolierung von Phosphatiden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München



vorgelegt

von

Günther Richter

aus

Dresden

Oktober 1958

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1958

Zur papierchromatographischen Auftrennung von Phosphatiden

I. Mitteilung

Von

LUDWIG HÖRHAMMER, HILDEBERT WAGNER und GÜNTHER RICHTER

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre
der Universität München

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 19. Februar 1959)

Über die papierchromatographische Auftrennung von Phosphatiden wurde schon mehrfach berichtet. Als erste versuchten BEVAN, GREGORY, MALKIN u. POOLE [3] die Trennung von Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin. LEA u. RHODES [16, 17] entwickelten die Methode weiter und erreichten auf Kieselsäure-imprägnierten Papieren eine gute Trennung für Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin und Lyso-Phosphatidyläthanolamin. Versuche an anderen Phosphatidgemischen mit neuen Lösungsmittelsystemen oder imprägnierten Papieren unternahmen AMELUNG u. BÖHM [1], DIECKERT u. REISER [8] und DOUSTE-BLAZY u. Mitarb. [9]. Nachdem ROUSER u. Mitarb. [22] erkannten, daß die starke Bindungsfähigkeit stickstoffhaltiger Phosphatide an Cellulose durch ihre positiv geladene Aminogruppe bedingt ist, kaschierten sie diese durch Acylierung und erhielten damit noch bessere Ergebnisse. In letzter Zeit konnten BEISS u. ARMBRUSTER [2] und MARINETTI u. STOTZ [19, 20] die Trenntechnik in einer Reihe von Fällen verbessern.

Mit Ausnahme der letztgenannten Arbeiten [2, 20, 22] gelang die papierchromatographische Auftrennung bisher nur von Mischungen *reiner Phosphatide*, während die Auftrennung chemisch unveränderter *Rohphosphatidgemische*, wie sie bei der Extraktion pflanzlicher und tierischer Gewebe anfallen, bis auf die genannten Fälle nicht erreicht wurde. Da auch die bisher veröffentlichten Verfahren zur Auftrennung von Rohphosphatidgemischen — soweit reproduzierbar — noch umständlich und zeitraubend waren, ließ sich eine systematische papierchromatographische Untersuchung pflanzlicher und tierischer Organe auf Phosphatide bis heute nicht durchführen.

Auf der Suche nach einem hierfür geeigneten Verfahren haben wir in einem mit *Formaldehyd* behandelten Schl. & Sch.-Chromatographierpapier und dem bekannten Butanol-Eisessig-Wasser-System als

Laufmittel eine einfache und gut reproduzierbare Methode entwickelt, die sich in unseren Laboratorien bei der systematischen Untersuchung pflanzlicher und tierischer Phosphatidgemische gut bewährt hat.

Experimenteller Teil

1. *Herstellung von Formalinpapier*¹. Chromatogrammpapier Nr. 2043 b Gl. der Firma Schl. & Sch. wurde in Stücke von 36 cm Breite und 25 cm Höhe (für die aufsteigende Technik) und 22 cm Breite und 57 cm Höhe (für die absteigende Technik) geschnitten, die Blätter aufeinander gelegt und nicht zu eng zu einem Zylinder gerollt. Die Rolle wurde in eine doppelte Lage Filtrierpapier eingepackt und das entstandene Paket aufrecht in einen Autoklaven auf eine Porzellansiebplatte gestellt. Dann wurde mit einer Mischung aus 100 Teilen Formaldehyd solutus, DAB 6, 5 Teilen Eisessig (p.a.) und 0,2 Teilen Ammoniumrhodanid übergossen. Nach etwa 1 Std hatte sich das Papier gleichmäßig mit den Lösungsmitteln vollgesogen. Anschließend erhitzen wir 3 Std auf 123° C bei 3 atü. Nach dem Abkühlen wurde der Zylinder in einer Schale mit fließendem Leitungswasser auseinandergerollt und über Nacht kontinuierlich gewaschen. Nach dem Abtropfen erfolgte die Trocknung der aufgehängten Papiere bei Raumtemperatur. Zur Glättung werden nach dem Trocknen die Bögen über Dampf gehalten, aufeinandergelegt und beschwert. Die Imprägnierlösung kann mehrmals verwendet werden, wenn sie mit Formaldehyd ergänzt, mit Eisessig wieder auf einen p_H-Wert von 2,55 gebracht und neues Ammoniumrhodanid hinzugefügt wird.

2. *Laufmittel*. Verwendung findet die Oberphase einer n-Butanol-Eisessig-Wasser-Mischung im Verhältnis 4:1:5. In manchen Fällen bewährt sich auch eine Mischung, die aus 20 Volumenteilen dieser Oberphase und 5 Teilen peroxydfreiem Äther durch Sättigung hergestellt wird. Laufzeit für die aufsteigende Technik: 4½–6 Std, für die absteigende Technik: 18 Std. Die Temperatur soll nicht mehr als 15° C betragen, da sich andernfalls der Trenneffekt verschlechtert.

3. *Chromatographie mit Formalinpapier*. Aufgetragen werden 40–100 γ Lipoidgemisch im Stickstoffstrom. Für die aufsteigende Technik werden die Chromatogramme zum Zylinder gerollt und mit den an den Rändern eingeschnittenen Schnallen bzw. Schlaufen befestigt. Abstand der Startlinie vom unteren Rand = 2,5 cm, Durchmesser der das Laufmittel aufnehmenden Petri-Schalen = 12 cm. Menge des beim Start vorhandenen Laufmittels = 30 ml. Abstand des Startpunktes vom Papierrand = 3 cm. Abstand der Startpunkte untereinander = 2,5 cm. Für die absteigende Technik wurden Glaskammern der Fa. Bender & Hobein, München, verwendet. Die Trocknung der Chromatogramme erfolgte bei Raumtemperatur.

4. *Sichtbarmachen der Flecke*. a) Phosphormolybdänsäurefärbung (1%ig) auf cholinhaltige Phosphatide nach DOUSTE-BLAZY u. Mitarb. [9].

b) Rhodamin-B-Färbung (0,01%ig) auf Phospholipide nach MARINETTI u. STOTZ [19].

c) Nilblaufärbung (1%ig) auf saure Lipide, z. B. Cardiolipin, PS und MPI nach HACK [13].

d) Fuchsin-schweflige Säure (0,025% Fuchsin) nach Behandlung mit Quecksilberchloridlösung auf Plasmalogene und Fetaldehyde nach HACK [13].

e) Ninhydrinfärbung (0,2% Ninhydrin in 95 Teilen n-Butanol und 5 Teilen 2 n Essigsäure) auf aminohaltige Phosphatide und Aminosäuren nach CRAMER [5].

¹ Auf Wunsch können imprägnierte Papiere für die aufsteigende und absteigende Technik zur Verfügung gestellt werden.

f) Osmiumtetroxydfärbung auf ungesättigte Fettsäuren und Aldehydgruppen nach HACK [13].

g) *Malachitgrünfärbung* nach folgender Vorschrift: Die Chromatogramme werden 15 min in Malachitgrünlösung (0,25 g/500 ml) belassen und der überschüssige Farbstoff durch mehrmaliges Auswaschen mit Leitungswasser entfernt. Die Lysoverbindungen erscheinen beim langsamen Trocknen am Tageslicht als weiße Flecke auf hellgrünem Grund.

5. *Herkunft der Substanzen*. PCh ex ovo Merck, gereinigt über Kieselsäuresäulen nach SMITH [23], PÄ aus Rinderherz, angereichert durch Craig-Verteilung¹, PÄ aus Rinderhirn, isoliert nach DEBUCH [6], PS aus Rinderherz, isoliert durch Craig-Verteilung nach einer Vorschrift von G. RICHTER¹, PS aus Rinderhirn, isoliert durch Craig-Verteilung nach einer Vorschrift von J. HÖLZL², MPI aus Rinderherz, dargestellt nach FAURE u. MORELEC-COULON [11], MPI aus Rinderhirn, isoliert durch Craig-Verteilung von J. HÖLZL², MPI aus Sojalecithin, dargestellt durch Craig-Verteilung [15], DPI aus Rinderhirn, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. FOLCH-Pi, Waverley, Mass. USA, Lipositol (Phytoglycolipid) aus Sojalecithin des Handels isoliert durch Craig-Verteilung [15], DPI aus Erdnüssen, isoliert nach MALKIN u. POOLE [18], Synth. Sphingomyelin aus der Sammlung von Prof. Dr. E. STOTZ, Rochester, N.Y., Cerebrosid aus der Sammlung von Prof. Dr. E. KLENK, Köln, Cardiolipin nach FAURE u. MORELEC-COULON [10] isoliert, Lyso-PCh, hergestellt aus Lecithin Merck durch Bienengiftphospholipasespaltung nach HANAHAN, RODBELL u. TURNER [14], Lyso-Verbindungen von PÄ, PS und MPI, angereichert durch Fraktionierung mit Fällungsmitteln und Craig-Verteilung.

Ergebnisse

1. *Nachweis der Phosphatide*. Gute Auftrennungen wurden erreicht für Rohphosphatidgemische bzw. Fraktionen, die nebeneinander PCh, Lyso-PCh, PS, Lyso-PS, MPI, Lyso-MPI, DPI³ und Gangliosid enthielten. PCh und PÄ, die sich in dem verwendeten Lösungsmittel in den R_F -Werten nur geringfügig unterscheiden, lassen sich gut durch ihre unterschiedliche Anfärbbarkeit mit Phosphormolybdänsäure und Ninhydrin nebeneinander nachweisen. Enthält der zu analysierende Extrakt gleichzeitig noch Sphingomyelin, Cardiolipin oder Cerebroside, so ist eine Vorfraktionierung bzw. Abtrennung des Lecithins und Kephalsins notwendig⁴. Die durch Zersetzung abgespaltenen aminohaltigen Bestandteile lassen sich gut erkennen.

Nicht phosphatidartige Verunreinigungen (freie Fettsäuren, Plasmale, freies und verestertes Cholesterin) laufen mit der Lösungsmittelfront und stören die Auftrennung bzw. den Nachweis der Phosphatide nur wenig. Enthält das Phosphatidgemisch größere Mengen an Triglyceriden und Cholesterin, so wird man diese zuvor nach dem Verfahren von BLOOR [4] abtrennen.

¹ Dissertation G. RICHTER, München 1958.

² Dissertation J. HÖLZL, München (in Vorbereitung).

³ PCh = Phosphatidylcholin; PÄ = Phosphatidyläthanolamin; PS = Phosphatidylserin; MPI = Monophosphoinositid; DPI = Diphosphoinositid.

⁴ Über die papierchromatographische Auftrennung von Sphingomyelin und Cerebroside berichten wir in einer weiteren Mitteilung.

Die R_F -Werte der einzelnen Phosphatide, Mittelwerte zahlreicher Einzelbestimmungen, sind für die aufsteigende (a) und absteigende (b) Methode in Tab.1 angegeben. Wann absteigend oder aufsteigend zu arbeiten ist, richtet sich nach der Art des Trennproblems.

Um beispielsweise den Verlauf einer Craig-Verteilung kennenzulernen, genügt die aufsteigende Technik. Liegt ein Gemisch von mehr als 5 Phosphatiden vor oder handelt es sich darum, die Reinheit eines isolierten Phosphatids zu prüfen, so wird man das absteigende Verfahren

Tabelle 1

Phosphatid ¹	R_F -Wert ² nach a	R_F -Wert nach b
Phosphatidylcholin ex ovo Merck	0,78	0,73
Sphingomyelin synth.	0,76	0,86
Cardiolipin	0,80	—
Phosphatidyläthanolamin	0,76	0,73
Cerebrosid KLENK A.	0,86	—
Cerebrosid KLENK B.	0,62	—
Cerebrosid KLENK C	0,58	—
Cerebrosid KLENK D	0,35	—
Phosphatidylserin aus Rinderhirn	0,53	0,51
Phosphatidylserin aus Rinderherz	0,53	0,51
Monophosphoinositid aus Rinderherz	0,42	0,43
Monophosphoinositid aus Rinderhirn	0,42	0,43
Monophosphoinositid aus Soja	0,42	0,43
Monophosphoinositid aus Rinderleber	0,42	0,43
Diphosphoinositid aus Rinderhirn	0,33—0,36	0,19 0,24 0,28
Lipositol (Phytoglycolipid) aus Soja	0,25—0,28	0,15—0,25
Inositphosphatid aus Erdnüssen.	0,20	0,20

¹ Herkunft der Substanzen: siehe „Experimenteller Teil“.

² Die angegebenen R_F -Werte, Mittelwerte zahlreicher Einzelbestimmungen, gelten streng für die im experimentellen Teil angegebenen Versuchsbedingungen. Sie können schon durch geringe Veränderung der Lösungsmittel oder der Temperatur zu höheren oder niederen Werten verschoben werden. Das Mitlaufenlassen von Reinsubstanzen ist daher unbedingt erforderlich.

anwenden. Zum Sichtbarmachen der einzelnen Phosphatide verwendeten wir die im experimentellen Teil unter a—f zusammengestellten Reagentien, wobei sich das Hintereinanderanfärben der Chromatogramme in der Reihenfolge Ninhydrin, Phosphormolybdänsäure, Rhodamin und Nilblau gut bewährt hat. Das Anfärben der Phosphatide mit Ninhydrin wird weder durch das Imprägniermittel noch durch das Laufmittel beeinträchtigt, wie dies bei anderen Systemen und imprägnierten Papieren zu beobachten ist. Im einzelnen erhielten wir mit Hilfe der auf- und absteigenden Methode allein oder in Verbindung mit anderen Fraktionierungsverfahren folgende Ergebnisse:

a) Es gelang der Nachweis und die anschließende Isolierung eines bisher noch unentdeckt gebliebenen MPI aus *Rinderhirn*, das sich zum Unterschied von den Monophosphoinositiden des Herzmuskels und der Leber nur in der absteigenden Chromatographie von dem PS trennte [15] (siehe Abb. 1),

b) die Reindarstellung von PS aus Rinderherzmuskel,

c) die Aufklärung der substanzmäßigen Zusammensetzung der *alkoholunlöslichen Soja-inositidfraction*¹ [15],

d) die weitere Auftrennung des von FOLCH [12] für einheitlich angesehenen DPI aus *Rinderhirn* (siehe Abb. 1),

e) die Ausarbeitung eines vereinfachten Isolierungsverfahrens für Sphingomyelin und Cerebrosid aus Rinderhirn² und

f) die qualitative Analyse einiger Pflanzenphosphatidextrakte.

2. *Nachweis von Lyso-Phosphatiden.* Beim Anfärben von Phosphatidchromatogrammen mit Rhodamin B- oder Nilblau-Lösung beobachteten wir, daß neben roten bzw. blauen Farbflächen mitunter auch weiße Flecken auftraten, die erst beim Trocknen der Chromatogramme entstanden waren. Die Flecke erschienen unter dem UV-Licht als blaue, nicht fluoreszierende Flecke und unterschieden sich darin deutlich von der rosaroten Fluoreszenz der Phosphatide. Anhand von Testsubstanzen war eine Zuordnung zu Lysoverbindungen möglich. Allerdings hatte die Rhodaminfärbung den Nachteil, daß geringe Mengen an Lysoverbindungen nicht mehr ansprachen. Auf der Suche nach besseren Färbemitteln fanden wir in dem Triphenylmethanfarbstoff *Malachitgrün* ein Reagens, das dem Rhodamin an Spezifität überlegen war. Sämtliche Lysoverbindungen — bisher waren solche nur vom PCh, PÄ und PS bekannt — wurden beim langsamen Trocknen am Licht der mit diesem Reagens angefärbten Chromatogramme als scharf umrandete weiße

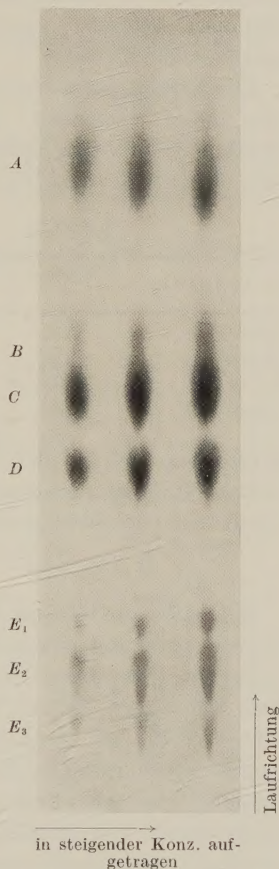


Abb. 1. Vorfraktionierter *Rinderhirnphosphatid-Extrakt* nach der absteigenden Methode chromatographiert. Das Chromatogramm wurde aus Gründen der photographischen Wiedergabe mit einer 1%igen Nilblaulösung angefärbt. A PÄ, B Lyso-PÄ, C PS, D MPI, E₁, E₂, E₃ = DPI

¹ H. WAGNER: Habilitationsschrift, München (in Vorbereitung).

² S. WIELAND: Dissertation, München (in Vorbereitung).

Flecken auf hellgrünem Untergrund sichtbar, während die intakten Phosphatide dabei selbst grüne Flecken liefern. Welcher Reaktionsmechanismus diesem Vorgang zugrunde liegt, ob eine bloße Farb-
abstufung, ein oxydativer Prozeß oder eine direkte Veränderung der chemischen Substanz, ist nicht bekannt, doch fällt auf, daß auch das Saponin „Merck“ gegenüber Rhodamin B und Malachitgrün den gleichen Effekt zeigt.

Die Verwendung des neuen Reagenses führte zu der Feststellung, daß alle ohne besondere Vorsichtsmaßregeln gewonnenen Phosphatid-
Extrakte einen erheblichen Anteil an Lysoverbindungen aufweisen, wie dies RHODES u. LEA [21] bereits früher bei einem Ei-Phosphatidextrakt

Tabelle 2

Lysoverbindung	R _F -Wert a	R _F -Wert b
Lyso-PCh .	0,55	0,57
Lyso-PÄ . .	0,51	0,57
Lyso-PS . .	0,39	0,37
Lyso-MPI . .	0,30	0,32

und DEBUCH [7] beim käuflichen Sojalecithin festgestellt haben. Mit Hilfe von Malachitgrün gelang es uns außerdem nachzuweisen, daß sich auch *Monophosphoinositide* zu *Lysoverbindungen* abbauen lassen. Ihre Lysoformen konnten wir bei der Auf-
arbeitung von *Rinderhirnphosphatid*-Extrakten und bei der Fraktionierung des *Handels-Sojalecithins* nachweisen. Im folgenden sind die R_F-Werte der einzelnen Lysoverbindungen für die aufsteigende(a) und absteigende(b) Technik angegeben (siehe Tab. 2).

Zusammenfassung

Mit Hilfe eines nach besonderem Verfahren hergestellten Formalin-
papiertes und mit einem Butanol-Eisessig-Wasser-System als Laufmittel gelang eine reproduzierbare Auftrennung von *Rohphosphatidgemischen*. Das Verfahren führte zum Nachweis bisher unbekannt gebliebener Phosphatide in verschiedenen Organextrakten und zur Aufstellung neuer übersichtlicher Isolierungsverfahren. Es gestattete die Schnellanalyse einzelner Fraktionen einer Craig-Verteilung und lieferte die Möglichkeit zur Reinheitsprüfung einzelner Phosphatide. Für systematische Untersuchungen in pflanzlichen und tierischen Geweben bedeutet die Methode eine wesentliche Hilfe, da sich in den meisten Fällen zeitraubende Fraktionierungsverfahren erübrigen. Zum Nachweis von Lyso-Phosphatiden hat sich Malachitgrün als neues spezifisches Reagens bewährt.

Summary

Using a specially prepared formaldehyde paper and a butanol-glacial acetic acid- water mixture as a solvent *crude phosphatide mixtures* can be reproducibly separated. The procedure led to the discovery of hitherto unknown phosphatides in various organ extracts and to the formulation of new isolation procedures. Single fractions from a Craig counter current

distribution could be rapidly analyzed; individual phosphatides could be checked for their purity. The method is helpful for systematic investigations of plant and animal tissues, since time consuming fractionations can be avoided. Malachite green was found to be a new specific reagent for the determination of lysophosphatides.

Der Firma Etapharm, Wien, danken wir für die zur Verfügung gestellten Rinderhirn- und Herzmuskelextrakte.

Der Firma Buer, Köln-Braunsfeld, sei ebenfalls für die Überlassung größerer Mengen Sojalecithin gedankt.

Reinphosphatide stellten dankenswerterweise zur Verfügung: Prof. Dr. E. KLENK, Köln, Prof. Dr. E. STOTZ, Rochester, N.Y., und Prof. Dr. J. FOLCH, New York, N.Y.

Bienengift für die Enzymversuche verdanken wir Herrn Dr. FORSTER, Firma Mack, Illertissen.

Für Assistenz und Ausführung der photographischen Arbeiten danken wir Fräulein E. HÖRHAMMER und Fräulein H. STEGMÜLLER.

Literatur

- [1] AMELUNG, D., u. P. BÖHM: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **298**, 199 (1954). — [2] BEISS, U., u. O. ARMBRUSTER: Z. Naturforsch. **13b**, 79 (1958). — [3] BEVAN, T. H., G. J. GREGORY, T. MALKIN and A. G. POOLE: J. chem. Soc. **1951**, 841. — [4] BLOOR, W. R.: J. biol. Chem. **82**, 273 (1929). — [5] CRAMER, F.: „Papierchromatographie“, Weinheim/Bergstr.: 1953. — [6] DEBUCH, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **304**, 109 (1956). — [7] DEBUCH, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **306**, 279 (1957). — [8] DIECKERT, J. W., and R. REISER: J. Amer. Oil Chemists' Soc. **23**, 535 (1956). — [9] DOUSTE-BLAZY, L., J. POLONOVSKI u. P. VALDIGUIÉ: Bull. Soc. Chim. biol. **38**, 19 (1956). — [10] FAURE, M., and M. J. MORELEC-COULON: Ann. Inst. Pasteur **91**, 537 (1956). — [11] FAURE, M., and M. J. MORELEC-COULON: C. R. Acad. sci. (Paris) **238**, 411 (1954). — [12] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **177**, 505 (1949). — [13] HACK, H.: Biochem. J. **54**, 602 (1953). — [14] HANAHAN, D. J., M. RODBELL and L. D. TURNER: J. biol. Chem. **206**, 431 (1954). — [15] HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. J. HÖLZL: Biochem. Z. **330**, 591 (1958). — [16] LEA, C. H., and D. N. RHODES: Biochem. J. **54**, 467 (1953). — [17] LEA, C. H., D. N. RHODES and R. D. STOLL: Biochem. J. **60**, 353 (1955). — [18] MALKIN, T., and A. G. POOLE: J. chem. Soc. **1953**, 3470. — [19] MARINETTI, G. V., and E. STOTZ: J. Amer. chem. Soc. **77**, 6668 (1955). — [20] MARINETTI, G. V., and E. STOTZ: Biochim. biophys. Acta **21**, 168 (1956). — [21] RHODES, D. N., and C. H. LEA: Biochem. J. **65**, 526 (1957). — [22] ROUSER, G., G. V. MARINETTI and J. F. BERRY: Fed. Proc. **14**, 202 (1955). — [23] SMITH, R. H.: Biochem. J. **57**, 130 (1954).

Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität, München 2, Karlstraße 29

LEBENS LAUF

Am 26. 4. 1926 wurde ich in Dresden als Sohn des Kaufmannes Horst Richter und seiner Ehefrau Erna, geb. Hübel, geboren.

Von 1932 bis 1936 besuchte ich die 11. Volksschule in Dresden, von 1936 bis 1943 die Dietrich-Eckart-Schule am gleichen Ort. Arbeitsdienst und Kriegseinsatz füllten die Zeit bis zum Mai 1945 aus. Als Abschluß der zweijährigen Praktikantenzeit in der Flora-Apotheke in Dresden legte ich im März 1947 das Pharmazeutische Vorexamen ab, nachdem ich die gültige Reifeprüfung nachgeholt hatte.

Am 13. Juni 1948 verließ ich die Ostzone und trat eine Stelle in der Phönix-Apotheke in Duisburg-Ruhrort an.

Das Pharmaziestudium begann ich im Wintersemester 1950/51 an der Philosophisch-Theologischen Hochschule in Passau und setzte es anschließend an der Universität München fort. Mein Pharmazeutisches Staatsexamen bestand ich im Frühjahr 1954. Danach ging ich für zwei Jahre in die Hertelrich'sche Apotheke nach Dorfen/Obb.

Im Juni 1956 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer die vorliegende Arbeit, die bis zum November 1958 abgeschlossen werden konnte.

Seit Januar 1958 bin ich Inhaber einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am obigen Institut.

